

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
13 février 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/012137 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12Q 1/68,  
G01N 33/50, 33/53, A01K 67/027, C12N 5/10, A61K  
31/00, A61P 25/16

(74) Mandataire : BOUVET, Philippe; Aventis Pharma S.A.,  
Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165  
Antony Cedex (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/02761

(22) Date de dépôt international : 31 juillet 2002 (31.07.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/10456 3 août 2001 (03.08.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : AVEN-  
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron,  
F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LU-  
COTTE, Gérard [FR/FR]; 38, rue Jean-Baptiste  
Lamarck, F-78700 Conflans Saint Honorine (FR).  
DENEFFLE, Patrice [FR/FR]; 45, avenue des Fusillés  
de Châteaubriand, F-94100 Saint Maur (FR). ROSIER,  
Marie-Françoise [FR/FR]; 21, rue des Baconnets,  
F-92160 Antony (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHODS FOR DETECTING PARKINSON'S DISEASE

(54) Titre : METHODES DE DETECTION DE LA MALADIE DE PARKINSON

(57) Abstract: The invention concerns methods for diagnosis or prognosis of Parkinson's disease in a subject. Said method comprises steps which consist in detecting the presence or the absence of the CYP2D6-B homozygotic mutation and the GSTM1 homozygotic deletion. The joint presence of the CYP2D6-B homozygotic mutation and the GSTM1 homozygotic deletion indicates that the subject may be suffering from Parkinson's disease or shows an increased risk of developing Parkinson's disease.

(57) Abrégé : Méthodes de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet. Ladite méthode comprend les étapes de détection de la présence ou de l'absence de la mutation homozygote CYP2D6-B d'une part, et de la délétion homozygote de GSTM1 d'autre part. La présence conjointe de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la délétion homozygote de GSTM1 indique que le sujet peut être atteint de la maladie de Parkinson ou bien présente un risque accru de développer la maladie de Parkinson.

WO 03/012137 A2



## MÉTHODES DE DÉTECTION DE LA MALADIE DE PARKINSON

La présente invention se rapporte à des méthodes de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet, dans lesquelles la présence conjointe de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la délétion homozygote de GSTM1 indique que ledit sujet peut être atteint de la maladie de Parkinson ou bien présente un risque accru de développer la maladie de Parkinson. La présente invention concerne également les kits de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson, et les animaux double transgéniques dans le génome desquels est insérée une séquence d'ADN exogène génomique portant la mutation homozygote CYP2D6-B et présentant l'invalidation du gène GSTM1, leur procédé d'obtention et leur utilisation afin de tester l'activité d'agents ou de méthodes destinés à prévenir et/ou traiter la maladie de Parkinson.

La maladie de Parkinson est un trouble neurologique qui apparaît généralement avec l'âge. Les changements neurologiques à l'origine de cette maladie sont variables et encore relativement incompris. Le trouble se développe généralement de façon asymétrique, débute par des tremblements dans une main ou une jambe, et progresse en une perte symétrique des mouvements volontaires. Eventuellement, le patient est frappé d'incapacité du fait de la sévérité des symptômes tels que les tremblements, la bradykinésie (pauvreté des mouvements) et la rigidité musculaire. Dans les états les plus avancés, la maladie est souvent accompagnée de démence.

Jusqu'à présent, le diagnostic des cas aussi bien familiaux que sporadiques de la maladie de Parkinson n'est généralement fait qu'après apparition des symptômes. Des composés anticholinergiques, le propranolol, la primidone et la L-dopa sont alors fréquemment administrés afin de modifier les transmissions neuronales et ainsi supprimer les symptômes de la maladie. Cependant, il n'existe à ce jour aucune thérapie permettant de stopper ou de ralentir la progression sous-jacente de la maladie. Or, une telle maladie progresse souvent rapidement et perturbe de nombreuses fonctions vitales majeures. Le temps constitue donc un facteur crucial dans le choix et l'administration de différentes options de traitements.

La difficulté à trouver une thérapie s'explique notamment par le fait que l'étiologie de la maladie de Parkinson reste largement inconnue. Il y a plusieurs dizaines d'années, des facteurs environnementaux ont été tenus pour responsables de la pathogenèse de la maladie. Cependant, l'identification ces dernières années de mutations dans trois gènes différents, l' $\alpha$ -synucléine, la parkine et l'hydroxylase ubiquitin carboxy-terminale, a permis de souligner l'importance des facteurs génétiques, du moins pour certains cas de parkinsonisme. Aujourd'hui, on pense que la maladie de Parkinson est certainement causée par des neurotoxines environnementales vis-à-vis desquelles certaines personnes ont une susceptibilité d'origine génétique.

Une partie de cette susceptibilité semble notamment conférée par l'existence de polymorphismes dans le gène CYP2D6 codant pour le cytochrome P450 2D6, responsable de la métabolisation de différents produits et agents environnementaux, parmi lesquels probablement des neurotoxines tel que le MPTP, produit chimique dont l'implication dans la maladie de Parkinson est déjà connue. De nombreuses études ont ainsi rapporté l'existence d'une association entre certaines mutations alléliques dans CYP2D6, en particulier avec l'allèle CYP2D6-B (ou D6\*4) qui présente une transition G  $\rightarrow$  A à la jonction intron 3/exon 4 qui entraîne une déficience métabolique, et la maladie de Parkinson (Armstrong et al., *The Lancet*, 1992, 339, pp.1017-8 ; Smith et al., *The Lancet*, 1992, 339, pp. 1375-7 ; Kurth et al., *Am. J. of Med. Genet.*, 1993, 48, pp. 166-8 ; Lucotte et al., *Am. J. of Med. Genet.*, 1996, 67, pp. 361-5 ; McCann et al., *J. of Neurol. Sci.*, 1997, 153, pp. 50-3). On estime aujourd'hui qu'environ 2 à 3 % des personnes de la population générale portent la mutation homozygote CYP2D6-B.

Par ailleurs, les glutathion S-transférases (GSTs), parmi lesquelles GSTM1, sont une famille d'enzymes dimères également impliquées dans des processus de détoxification : elles catalysent la conjugaison entre le glutathion et des produits toxiques tels que les carcinogènes, les polluants et un large spectre de xénobiotiques. Il a également été montré que les personnes atteintes de la maladie de Parkinson avaient plus fréquemment un génotype présentant la délétion homozygote de GSTM1

que les personnes non-malades (Stroombergen et al., *Hum. & Exper. Toxicol.*, 1999, 18, pp. 141-145). Par « délétion homozygote » de GSTM1, on entend au sens de la présente invention que le gène GSTM1 possède ses deux allèles mutés de telle sorte qu'elles sont toutes les deux non-fonctionnelles, ce qui résulte en l'absence d'une  
5 protéine GSTM1 fonctionnelle. L'absence de cette protéine également impliquée dans des processus de détoxification constituerait également un facteur de susceptibilité à la maladie de Parkinson. On estime aujourd'hui qu'environ 50 % des personnes de la population générale présentent la délétion homozygote de GSTM1.

La présente invention repose sur la découverte que les sujets présentant  
10 conjointement la mutation homozygote CYP2D6-B et dont le génome est homozygote pour la délétion de GSTM1 ont un risque accru de développer la maladie de Parkinson, ce risque étant supérieur à celui de sujets ne présentant que la mutation homozygote CYP2D6-B ou bien n'étant que homozygote pour la délétion de GSTM1, comme rapporté dans les études mentionnées ci-avant.

15 Cette découverte est particulièrement intéressante car elle permet de confirmer et/ou de pronostiquer la sévérité de l'atteinte chez les patients pour lesquels la maladie de parkinson a déjà été diagnostiquée ainsi que l'efficacité probable des traitements envisagés, ou encore de pronostiquer les risques d'apparition de la maladie chez des sujets ne présentant pas de symptômes de la maladie de Parkinson.

20 La présente invention a ainsi pour premier objet une méthode de diagnostic ou de pronostic la maladie de Parkinson chez un sujet. Ladite méthode comprend les étapes de détection de la présence de la mutation homozygote CYP2D6-B d'une part, et de la délétion homozygote de GSTM1 d'autre part. La présence conjointe de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la délétion homozygote de GSTM1 indique  
25 que le sujet peut être atteint par la maladie de Parkinson ou bien présente un risque accru de développer la maladie de Parkinson. Des sujets appropriés peuvent être choisis par exemple parmi :

- les personnes qui ne présentent pas les symptômes de la maladie de Parkinson,

- les personnes chez lesquelles le risque de développer la maladie de Parkinson a déjà été détecté, mais qui ne présentent pas encore les symptômes de la maladie, et
- les personnes qui ont préalablement été diagnostiqués comme étant atteintes de la maladie de Parkinson pour lesquelles une confirmation du diagnostic est souhaitée.

Les étapes de détection, simultanée ou non, de la présence ou de l'absence de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la délétion homozygote de GSTM1 sont effectuées directement ou indirectement par tout moyen approprié à partir d'échantillons biologiques.

La présente invention concerne donc également une méthode de criblage d'échantillons biologiques prélevés sur des sujets, notamment des sujets ne présentant pas de symptômes de la maladie de Parkinson, pour détecter la présence d'échantillons de sujets fortement susceptibles de développer la maladie de Parkinson, ledit criblage comprenant la recherche, de manière simultanée ou non, dans lesdits échantillons biologiques, de la présence conjointe de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la délétion homozygote de GSTM1.

Lesdits échantillons contenant les ADN ou les protéines à identifier peuvent être de diverses origines. Il peut s'agir par exemple d'échantillons de sang, de sperme, de cheveux (avec leurs racines) ou de tout autre échantillon contenant des cellules nucléées. De préférence, les échantillons biologiques analysés sont des échantillons de sang. Dans ce cas, l'ADN à identifier est prélevé des leucocytes. Au sens de la présente invention, on entend par « échantillon biologique » soit des échantillons directement issus du sujet pour lequel on souhaite un diagnostic ou un pronostic sans autre transformation, soit des échantillons ayant subi une ou plusieurs étapes de préparation de façon à n'en conserver qu'une fraction utile pour les étapes de détection, par exemple un extrait cellulaire brut.

La détection des mutations dans CYP2D6 et GSTM1 peut être effectuée soit par détection de la seule présence ou non de la protéine CYP2D6-B et de la présence

ou de l'absence de GSTM1, soit par détection de la présence ou de l'absence de l'ADN portant la mutation homozygote CYP2D6-B et de l'ADN présentant la délétion homozygote de GSTM1.

5 Dans le cas de la détection de la protéine CYP2D6-B, on entend détecter au sens de la présente invention la protéine CYP2D6-B seulement à l'exclusion de toute autre forme mutée ou sauvage. Cela correspond donc à un individu possédant une ADN comprenant la mutation homozygote CYP2D6-B. Dans toute la suite, on utilisera les termes de «détection de la seule présence ou non de la protéine CYP2D6-B ».

10 Les étapes de détection des protéines CYP2D6 et de GSTM1 ou des ADN codant pour CYP2D6-B et GSTM1 peuvent être effectuées selon des méthodes directes ou indirectes bien connues de l'homme de l'art. En outre, lesdites étapes de détection de la présence ou de l'absence des protéines CYP2D6-B et GSTM1 ou des  
15 ADN portant la mutation homozygote CYP2D6-B et présentant la délétion homozygote de GSTM1, peuvent également être effectuées simultanément ou non pour chacun des deux gènes.

Si un échantillon biologique présente la protéine mutée CYP2D6-B à l'exclusion de toute autre forme mutée ou sauvage, ou bien contient de l'ADN portant la mutation homozygote CYP2D6-B, cela signifie plus précisément que l'échantillon  
20 analysé ne contient que la protéine mutante ou que l'ADN mutant, c'est-à-dire qu'aucune trace de la protéine ou de l'ADN sous forme sauvage ou sous une autre forme mutée n'a été détectée. De même, un échantillon correspondant à un sujet possédant la délétion homozygote de GSTM1 est, au sens de la présente invention, un échantillon dans lequel aucune trace de la protéine fonctionnelle GSTM1 n'a été  
25 détectée.

En ce qui concerne les techniques permettant de détecter ou d'identifier la présence ou l'absence des ADN portant la mutation homozygote CYP2D6-B et présentant la délétion homozygote de GSTM1, il peut s'agir par exemple de combinaisons des techniques de Réaction de Polymérisation en Chaîne (« PCR »), de

« Southern Blotting », de Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (« RFLP »), et/ou de séquençage direct des produits de la PCR. Toutes ces techniques sont maintenant bien connues de l'homme de l'art. D'une manière générale, toutes les techniques d'identification des ADN codant pour CYP2D6-B et GSTM1 qui peuvent  
5 être employées dans le cadre de la présente invention comprennent une étape préalable de collecte du ou des échantillons biologiques contenant les ADN à identifier et une étape d'extraction de l'ADN génomique selon les techniques standard bien connues de l'homme de l'art, par exemple selon la méthode de Smith et al. (*The Lancet*, 1992, 339, pp. 1375-7).

10 Succinctement, Il est possible d'utiliser la technique de PCR qui consiste tout d'abord à synthétiser des oligonucléotides complémentaires de la séquence des régions qui délimitent le segment d'ADN à amplifier (encore appelés « amorces »). Ces oligonucléotides servent d'amorce à la DNA polymérase. Puis, on entreprend les étapes de dénaturation par la chaleur (92-95°C) pour séparer les deux brins d'ADN,  
15 d'hybridation avec les deux amorces spécifiques grâce à un abaissement de la température (50-55°C) et d'extension des amorces avec une DNA polymérase à 70-72°C.

Pour obtenir à la fois une plus grande sensibilité et une meilleure spécificité, il est également possible d'effectuer deux PCR successives en utilisant deux couples  
20 d'amorces différents (« nested PCR ») : un premier couple d'amorces externes qui permet d'obtenir un fragment d'ADN amplifié comme en PCR classique et un second couple d'amorces internes pour amplifier le fragment d'ADN obtenu de la première PCR.

Afin de déterminer l'empreinte génétique de la région souhaitée, les fragments  
25 d'ADN obtenus par PCR peuvent également être séparés par électrophorèse selon leur taille et visualisés grâce au BET (bromure d'éthidium) et aux rayons ultraviolets.

Une possibilité particulièrement intéressante dans le cas présent consiste à effectuer une PCR avec un premier « primer » ayant à son extrémité 3' la séquence de nucléotides mutée, et un second « primer » ayant à son extrémité 3' la séquence de

nucléotides sauvage. La différence de température de dénaturation dans ces deux cas, et en conséquence d'efficacité d'amplification, permet de distinguer l'ADN mutant de l'ADN sauvage.

Selon une autre alternative, les fragments d'ADN amplifiés sont directement  
5 identifiés par une technique de « Dot » qui consiste à déposer un échantillon des fragments d'ADN produits de la PCR sur un filtre de nylon, à effectuer la dénaturation des fragments d'ADN, leur hybridation avec une sonde spécifique radioactive, un lavage pour éliminer l'excès de produit radioactif non-fixé et la réalisation d'un autoradiogramme. La révélation peut également être faite par d'autres  
10 moyens grâce à l'emploi de sondes spécifiques comportant un marqueur autre que radioactif, par exemple un colorant ou encore un marqueur fluorescent.

Selon une autre alternative, il est également possible de détecter la présence ou l'absence de mutations des ADN codant pour CYP2D6 et GSTM1 par séquençage direct de tout ou partie des fragments d'ADN amplifiés. Un tel procédé consiste à  
15 déterminer la séquence nucléotidique au niveau des positions polymorphes des gènes CYP2D6 et GSTM1. Le séquençage peut être effectué par toute méthode connue de l'homme de l'art, par exemple par la méthode de Sanger ou bien par la méthode de Maxam et Gilbert.

Selon une autre alternative, la détection de la présence ou l'absence des ADN  
20 portant la mutation homozygote CYP2D6-B et présentant la délétion homozygote de GSTM1 peut être effectuée en utilisant la technique de « Southern Blotting » qui consiste à effectuer une électrophorèse des fragments d'ADN obtenus après une attaque par une ou plusieurs enzymes de restriction. Le gel est ensuite dénaturé et un transfert est opéré sur une membrane de nylon. Cette membrane est destinée à être  
25 hybridée avec une sonde spécifique. Après lavage pour éliminer l'excès de produit radioactif non fixé, le film est appliqué sur la membrane. Il peut ainsi être décelé une ou plusieurs bandes correspondant aux fragments d'ADN reconnus par la sonde.

Il est également possible d'utiliser la technique de la RFLP associée à la technique de Southern Blotting et/ou de PCR pour détecter la présence ou l'absence



des mutations d'intérêt dans CYP2D6 et GSTM1. La RFLP permet de comparer les ADN de différents individus et de rechercher si des mutations ponctuelles faisant apparaître ou disparaître des sites de restriction se sont produites. Deux ADN de séquence identique traitées par des enzymes de restriction donneront des fragments  
5 identiques, et les Southern Blot obtenus avec ces fragments seront donc identiques. Au contraire, si un site de restriction a disparu ou bien est apparu à la suite d'une mutation, les fragments n'auront plus des tailles identiques ce qui sera visible sur les autoradiogrammes. Il en est de même si un nouveau site de restriction est apparu à la suite d'une mutation.

10 Selon la présente invention, il est également possible d'utiliser des méthodes indirectes pour déterminer la présence ou l'absence des ADN portant la mutation homozygote CYP2D6-B et présentant la délétion homozygote de GSTM1. Par exemple, si on détecte CYP2D6-A, c'est que le sujet n'est pas homozygote CYP2D6-B, ou encore, si on détecte CYP2D6-A et CYP2D6-C, c'est que le sujet ne comporte  
15 pas la mutation CYP2D6-B pour aucun des deux allèles.

Toutes les techniques décrites ci-avant sont bien connues de l'homme de l'art. Naturellement, toute autre technique connue et également appropriée pour la détection de la présence ou de l'absence de mutations de l'ADN codant pour CYP2D6 et GSTM1 peut être employée. On peut à ce titre par exemple citer les  
20 techniques de « Ligase Chain Reaction », « Strand Displacement Amplification », « Transcription-based Amplification » etc... De façon avantageuse, lesdites étapes de détection sont effectuée par PCR, RFLP, Southern Blotting et/ou une combinaison de ces techniques, conformément aux méthodes décrites dans la littérature (voir par exemple : Gough et al., *Nature*, 1990, 347, p.773 ; Kagimoto et al., *J. Biol. Chem.*,  
25 1990, 265, p. 17209 ; Wolf et al., *The Lancet*, 1990, 336, p. 1452 ; Hayashi et al., *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, p. 4797 ; Daly et al., *Pharmacogenetics*, 1991, 1, p. 33 ; Spurr et al., *Methods Enzymol.*, 1991, 206, p. 149 ; Armstrong et al., *The Lancet*, 1992, 339, p. 1017 ; Kurth et al., *Am. J. of Med. Genet.*, 1993, 48, p. 166 ; Lucotte et al., *Am. J. of Med. Genet.*, 1996, 67, p. 361 ; McCann et al., *J. Neurol. Sci.*, 1997,  
30 153, p. 50 ; Stroomborgen et al., *Hum. & Exper. Toxicol.*, 1999, 18, p. 141).

Selon une variante de l'invention, il est possible de détecter la seule présence ou non de la protéine CYP2D6-B et la présence ou l'absence de la protéine GSTM1 dans les échantillons biologiques collectés. Dans ce cas, il est possible d'utiliser d'une part des anticorps qui se lient sélectivement à CYP2D6-B et qui ne présentent  
5 essentiellement aucune liaison aux autres protéines isoformes de CYP2D6 dans les mêmes conditions, et d'autre part des anticorps qui se lient sélectivement à GSTM1. Afin de détecter si un sujet est homozygote ou hétérozygote pour CYP2D6-B, il est également possible d'employer plusieurs anticorps spécifiques des différentes mutations de CYP2D6.

10 De tels anticorps peuvent être obtenus selon les techniques connues de l'homme de l'art. Par exemple, les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon les techniques de Kohler et Mildstein (*Nature* 1975, 265, pp. 495-7). Pour ce faire, les protéines homozygotes CYP2D6-B et GSTM1 peuvent être obtenues à partir d'un sujet homozygote pour CYP2D6-B et GSTM1. Elles sont ensuite purifiées selon la  
15 technique décrite par Rall et al. (*Methods in Enzymol.*, 1986, 128, p. 273) et utilisées comme immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux. Selon une variante, un fragment seulement des protéines CYP2D6-B et GSTM1 peut être utilisé comme immunogène.

Au sens de la présente invention, on entend par « anticorps » tous les types  
20 d'immunoglobulines, y compris les IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Les anticorps utilisés peuvent être monoclonaux ou polyclonaux. Ils peuvent être d'origine naturelle ou bien être des anticorps chimères, ou encore ils peuvent inclure des fragments d'anticorps tels que des fragments Fab.

La réaction immunologique mise en jeu pour la détection de la seule présence  
25 ou non de la protéine CYP2D6-B et de la présence ou de l'absence de la protéine GSTM1 consiste de manière générale à mettre en contact les anticorps spécifiques et des marqueurs détectables avec l'échantillon biologique. Lorsque le/les anticorps(s) se lie(nt) aux protéines présentes dans l'échantillon, le signal émis par le marqueur est modifié. La réaction immunologique et la détection du signal émis par le marqueur

peuvent être effectuées soit de façon homogène dans une même solution, soit de façon hétérogène. Dans ce dernier cas, le/les anticorps sont immobilisés sur un support solide (billes, plateau...) et mis en contact avec une solution de l'échantillon biologique, puis le signal émis soit par le support solide soit par la solution est  
5 examiné. Selon la présente invention, les marqueurs émettant un signal peuvent être choisis parmi les marqueurs classiques bien connus de l'homme de l'art, notamment des marqueurs radioactifs, des marqueurs fluorescents ou encore des marqueurs enzymatiques.

Là encore, il est également possible d'utiliser des méthodes indirectes pour  
10 déterminer la seule présence ou non de la protéine CYP2D6-B et la présence ou l'absence de la protéine GSTM1. De même, la détection de la seule présence ou non de la protéine CYP2D6-B et la présence ou l'absence de la protéine GSTM1 peuvent être effectuées simultanément ou non. Naturellement, toute autre technique connue et également appropriée peut être employée. Il existe notamment de nombreuses  
15 variantes des tests immunologiques décrits ci-avant qui peuvent être avantageusement employées.

Toutes ces méthodes de détection sont particulièrement utiles car elles constituent la base permettant de déterminer si un sujet peut être atteint par la maladie de Parkinson ou bien présente un risque accru de développer la maladie de Parkinson.

20 Ainsi, un autre objet de la présente invention concerne une méthode d'analyse d'échantillons biologiques prélevés sur un sujet qui consiste à :

- a) déterminer le génotype pour CYP2D6 et GSTM1 dudit sujet, et
- b) convertir les données obtenues en a) afin de pronostiquer le risque dudit sujet de développer la maladie de Parkinson et l'efficacité de traitements  
25 thérapeutiques envisageables pour cette maladie.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne également les kits de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet.

De tels kits peuvent se présenter sous forme d'un emballage compartimenté de façon à recevoir différents récipients tels que par exemple des ampoules ou des tubes.

Chacun de ces récipients comprend les différents éléments nécessaires pour effectuer la détection de la présence ou de l'absence de l'ADN portant la mutation homozygote CYP2D6-B et présentant la délétion homozygote de GSTM1, ou pour effectuer la détection de la seule présence ou non de la protéine CYP2D6-B et la présence ou l'absence de la protéine GSTM1, individuellement ou mélangés. Lesdits éléments permettant d'effectuer la ou les réactions de détection sont choisis parmi ceux décrits ci-avant. Il peut s'agir par exemple :

- d'amorces hybridant une région définie de CYP2D6-B, d'amorces hybridant une région définie de GSTM1 et éventuellement les moyens nécessaires à la réalisation d'une réaction d'amplification,
- de sondes oligonucléotidiques, éventuellement immobilisées sur un support et comprenant un marqueur détectable, et éventuellement les réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction d'hybridation,
- ou encore d'anticorps capables de se lier sélectivement à GSTM1 éventuellement immobilisés sur un support, d'anticorps capables de se lier sélectivement à CYP2D6-B ou à d'autres mutations de CYP2D6 éventuellement immobilisés sur un support, et éventuellement les réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction immunologique.

Un autre objet de la présente invention est une méthode de traitement de la maladie de Parkinson caractérisée en ce qu'elle comprend :

- une ou plusieurs étapes, simultanées ou non, de détection de la présence conjointe de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la délétion homozygote de GSTM1 chez un sujet, et
- l'administration d'un composé, ou d'un mélange de composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie de Parkinson chez un sujet présentant conjointement la mutation homozygote CYP2D6-B et la délétion homozygote de GSTM1.

La présente demande est en outre relative à l'utilisation d'un composé, ou d'un mélange de composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie de

Parkinson pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'un sujet atteint par la maladie de Parkinson, chez lequel la présence conjointe de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la délétion homozygote de GSTM1 a été mise en évidence préalablement au traitement.

- 5 Lesdits composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie de Parkinson peuvent être la lévodopa, ou encore des des inhibiteurs sélectifs de la monoamine oxydase MAO-B, enzyme de dégradation de la dopamine dans le cerveau, tels que rasagiline ou selegiline. Ils peuvent aussi être des inhibiteurs de la catéchol-O méthyl-transférase (COMT), éventuellement en association avec la
- 10 lévodopa. Ils peuvent encore être, outre la lévodopa, précurseur de la dopamine, des agonistes dopaminergiques, tels que les produits suivants : bromocriptine , cabergoline, adrogolide, L-dopa, dopadose, ropinirole, pramipexole, rotigotine, spheramine, ou uridine.

- Les composés de l'association peuvent être administrés par voie orale, parentérale,
- 15 transdermale ou rectale soit simultanément soit séparément soit de façon étalée dans le temps.

Les composés sont formulés sous forme de compositions pharmaceutiques contenant l'association de un ou plusieurs composés tels que définis précédemment avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

- 20 Comme compositions solides pour administration orale, peuvent être utilisés des comprimés, des pilules, des poudres (capsules de gélatine, cachets) ou des granulés. Dans ces compositions, les principes actifs sont mélangés à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice, sous courant d'argon. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les
- 25 diluants, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tels que le stéarate de magnésium ou le talc, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops et des élixirs

pharmaceutiquement acceptables contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent comprendre des substances autres que les diluants, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants.

- 5 Les compositions stériles pour administration parentérale, peuvent être de préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylèneglycol, un polyéthylèneglycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle ou d'autres solvants organiques
- 10 convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions
- 15 solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales qui contiennent, outre le produit actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semisynthétiques ou des polyéthylèneglycols.

- 20 Les compositions pharmaceutiques renfermant l'association telle que définie précédemment contiennent généralement 0.1 à 500 mg de composé.

Les doses dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée; elles sont généralement de 0,1 à 500 mg par jour par voie orale pour un adulte de composé.

- 25 D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie appropriée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

La présente invention concerne en outre un nouveau modèle animal de la maladie de Parkinson exprimant la protéine CYP2D6-B à l'exclusion de toute autre forme mutée ou sauvage et n'exprimant pas la protéine GSTM1. Plus précisément, la présente invention concerne un nouveau modèle d'animal transgénique dans le  
5 génome duquel est inséré au moins une séquence d'ADN exogène portant la mutation homozygote CYP2D6-B de telle sorte que la fonction du gène CYP2D6 est modifiée, et dont le gène GSTM1 est inactivé. Encore plus précisément, la présente invention concerne un nouveau modèle d'animal transgénique qui est knock-out (KO) ou knock-in (KI) pour CYP2D6 et qui est knock-out pour GSTM1

10 On entend par animal transgénique tout animal non-humain présentant une modification artificielle de son génome. La modification du génome peut résulter d'une altération ou d'une modification de un ou plusieurs gènes par « knock-in » ou par « knock-out » (inactivation/modification de gènes par recombinaison homologue). Cette modification peut être due à l'action d'agents altérants ou mutagènes classiques  
15 ou bien effectuée par insertion stable d'une cassette d'expression permettant l'expression d'un gène hybride. En particulier, on peut par exemple opérer selon des méthodes identiques ou analogues à celles décrites dans les demandes WO 01/02552 ou encore WO 01/13176.

La modification du génome peut également résulter d'une insertion de gène(s)  
20 ou d'un remplacement de gène(s) dans sa (leur) forme sauvage ou mutée.

Les modifications sont avantageusement effectuées sur des cellules souches reproductrices de telle sorte que l'animal transgénique obtenu est KO ou KI pour CYP2D6 et KO pour GSTM1.

A l'heure actuelle, la modification du génome en utilisant la technologie  
25 « knock-in » et « knock-out » est limitée à la souris comme modèle du fait que seules les cellules souches (dites cellules « ES ») ayant la capacité de coloniser la lignée germinale issue de l'embryon de souris sont disponibles. Lorsque les lignées cellulaires ES seront établies pour d'autres espèces, ces technologies pourront facilement être appliquées par l'homme de l'art à ces autres espèces pour générer des

modèles KO et/ou KI. De plus, les approches basées sur l'utilisation d'oligonucléotides (ADN, ARN ou hybrides) seuls ou liés à des enzymes modifiant l'ADN/ARN, peuvent être utilisées pour introduire une modification/mutation définie à un locus prédéterminé dans le génome. Même des irradiations ou des mutagènes chimiques qui induisent des modifications aléatoires dans le génome peuvent être employées s'ils sont combinés avec un jeu efficace de marqueurs biologiques (phénotype) et avec une procédure de clonage positionnel à haut débit.

L'approche la plus directe pour la modification du génome d'animaux de laboratoire (souris, rats, vaches, cochons, moutons...) est cependant l'intégration aléatoire de transgènes par microinjection d'ADN linéarisé dans un ou deux pronucléi d'ovocytes fertilisés à l'étape de cellule unique (de préférence pour éviter la génération d'animaux chimériques bien que l'injection au stade deux cellules ou plus puisse également être mise en œuvre). En règle générale, un transgène est composé de deux parties : les éléments de régulation qui imposent le contrôle spatio-temporel de l'expression de l'ARN codé par l'ADNc, et ledit ADN juxtaposé (ADNc ou fragment génomique). Ces deux éléments (l'élément de régulation et l'ADN codant pour la protéine désirée) peuvent être homologues ou bien hétérologues du génome cible. Les animaux transgéniques concernés sont d'une manière générale choisis parmi les mammifères non-humains. Il peut s'agir par exemple de murins, à savoir les souris, les rats et les cobayes, de lapins, de chats, de chiens, d'ovins, ou encore de bovins. De préférence, il s'agit de murins, de rats ou de lapins obtenus selon les techniques classiques de transgénèse. D'autres objets de la présente invention sont des lignées de cellules souches et lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, dans le génome desquels est insérée au moins une séquence d'ADN exogène génomique portant la mutation homozygote CYP2D6-B et dont le gène GSTM1 est inactivé. Les technologies mentionnées ci-avant peuvent être appliquées pour générer des modèles animaux reproduisant les modifications génétiques trouvées chez les patients humains ou chez les individus « à risque » pour le développement de la maladie de Parkinson. Succinctement, l'obtention des animaux transgéniques, des



lignées de cellules souches et lignées de cellules différenciées selon l'invention consiste en un procédé mettant en œuvre les étapes suivantes :

- 5 a) la génération d'animaux transgéniques exprimant la protéine CYP2D6-B humaine à l'exclusion de toute autre forme sauvage ou mutée par insertion par recombinaison homologue d'un ADNc codant pour la protéine CYP2D6-B dans le gène correspondant de l'animal (l'insertion du transgène est ciblée immédiatement après le promoteur du gène de l'animal de façon à imposer le profil d'expression correct au transgène et à empêcher l'expression du gène endogène de l'animal : KO) ou bien par insertion de la mutation spécifique décrite dans la présente invention correspondant au gène isoforme CYP2D6-B  
10 humain dans le gène endogène de l'animal (la modification est faite par recombinaison homologue dans les cellules souches : KI),
- b) la génération d'animaux transgéniques ayant la fonction de GSTM1 inactivée par coupure du gène animal homologue du gène GSTM1 humain par  
15 recombinaison homologue dans les cellules souches selon la technologie KO (idéalement, la cassette de coupure est ciblée de façon à remplacer la partie 3' du promoteur et du premier exon codant afin d'empêcher toute possibilité d'obtenir des versions tronquées ou des isoformes d'épissage du gène animal),
- c) la génération d'animaux double transgéniques en introduisant les  
20 modifications décrites ci-avant en a) et en b) dans leur génome.

Les animaux doubles transgéniques ainsi obtenus reproduisent le génotype observé chez les patients atteints par la maladie de Parkinson ou « à risque ». Le contrôle du génotype pour CYP2D6 et GSTM1 de l'animal nouveau-né ainsi obtenu peut être effectué en utilisant les techniques déjà décrites ci-avant, notamment en  
25 utilisant une réaction d'amplification (PCR) et/ou de Southern.

Selon une variante de la présente invention, lesdits animaux transgéniques peuvent en outre exprimer une autre ou des autres protéine(s) peu ou pas actives et qui a/ont été déterminée(s) comme étant impliquée(s) dans la maladie de Parkinson (par exemple la protéine Parkine).

30 De tels animaux transgéniques sont particulièrement intéressants car ils fournissent un modèle avantageux pour la compréhension de la maladie de Parkinson qui reproduit très fidèlement les caractéristiques de la maladie de Parkinson. En

comparaison des modèles connus, ce modèle permet notamment la mise en évidence de composés particulièrement adaptés au traitement de la maladie de Parkinson, notamment telle que décrite chez l'homme. Ces composés peuvent être des molécules chimiques, des molécules peptidiques ou protéiques, des anticorps, des molécules  
5 chimériques ainsi que des ADNs antisens ou des ribozymes.

Les composés ainsi mis en évidence peuvent être utilisés comme médicament, tels quels ou en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable afin d'obtenir une composition pharmaceutique. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium  
10 ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les injections pouvant être réalisées par voie stéréotaxique, topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire,  
15 transdermique, etc.

La mise en évidence des composés décrits précédemment repose sur la mise en contact, notamment par une administration telle que par exemple une injection, du modèle animal de l'invention avec un composé ou un mélange de composés supposé(s) avoir une action et de mesurer ensuite le ou les effet(s) des composés  
20 notamment au niveau cérébral du modèle sur différents changements biochimiques et/ou histologiques.

Outre le fait de pouvoir tester *in vivo* des composés thérapeutiques permettant de prévenir, d'atténuer ou de guérir la maladie de Parkinson, ces animaux transgéniques permettent également de disposer d'un modèle animal de la maladie de  
25 Parkinson utile pour cribler des facteurs environnementaux qui induisent ou accélèrent la pathogenèse, ou encore pour étudier le comportement lors du développement de la maladie et étudier les divers mécanismes biologiques qui sont impliqués, par exemple dans le but de l'étude de nouveaux médicaments ou la détermination des quantités efficaces de médicaments et de la toxicité. Ainsi, un autre objet de la présente

invention concerne l'utilisation d'un animal transgénique, de lignées de cellules souches ou de lignées de cellules différenciées tels que définis ci-avant pour tester l'activité de composés ou de méthodes destinées à prévenir et/ou traiter la maladie de Parkinson. Un autre objet de l'invention concerne une cellule extraite des animaux transgéniques tels que décrits précédemment ainsi que son utilisation pour la mise en évidence de composés destinés au traitement de la maladie de Parkinson.

La mise en évidence de composés décrits précédemment repose sur la mise en contact de cellules extraites du modèle animal de l'invention avec un composé ou un mélange de composés supposé(s) avoir une action et de mesurer ensuite le ou les effets des composés au niveau des cellules entières, dans des homogénats de cellules ou sur une fraction sub-cellulaire, sur différents paramètres tels que la mort cellulaire par exemple.

Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples et figures qui suivent, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée.

### **EXEMPLES**

#### **Exemple 1 : Etude du génotype pour CYP2D6 et GSTM1 dans un échantillon de 103 patients**

103 patients (54 hommes et 49 femmes) sans liens de parentés entre eux et tous atteints de la maladie de Parkinson ont été recrutés dans des hôpitaux et cliniques de la région Champagne-Ardenne en France.

La maladie de Parkinson avait été cliniquement diagnostiquée pour tous ces patients selon les critères acceptés en la matière, à savoir la présence d'au moins 2 des caractéristiques principales de la maladie de Parkinson : tremblements, bradykinésie (pauvreté des mouvements), rigidité musculaire et détérioration des réflexes. Tous les

patients réagissaient positivement à la L-dopa. La moyenne d'âge des patients au début de la maladie était de 65,7 ans (écart : 25-88 ans).

10 ml de sang ont été obtenus de chaque patient, après consentement éclairé. L'ADN génomique a alors été isolé des leucocytes périphériques, en utilisant une  
5 procédure standard de digestion à la protéinase K et d'extraction phénol-chloroforme.

### **1. Méthode moléculaire**

Une combinaison de Southern Blotting, de PCR et de RFLP des produits de la PCR a été employée pour l'analyse du génotype de CYP2D6 qui compte 5 mutations alléliques différentes entraînant une déficience métabolique :

- 10 - la mutation CYP2D6-D (D6\*5) a été détectée après restriction par l'enzyme *Xba*I par hybridation Southern Blotting avec une sonde d'ADNc humain CYP2D6 (Gaedigk et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 48, pp. 943-950),
- 15 - la mutation CYP2D6-B (D6\*4) a été détectée par simple PCR et RFLP du produit de la PCR avec l'enzyme *Mva*I (Gough et al., *Nature*, 1990, 347, pp. 773-776),
- la mutation CYP2D6-T (D6\*6) a été détectée par simple PCR et RFLP du produit de la PCR avec l'enzyme *Bsr*I (Saxena et al., *Hum. Mol. Genet.*, 1994, 3, pp. 923-926),
- 20 - Les mutations CYP2D6-A (D6\*3) et CYP2D6-C (D6\*9) ont été détectées à l'aide de primers originaux spécifiques de séquence SEQ ID N°1 [5'-GATGAGCTGCTAACTGAGCCC-3' et SEQ ID N°2 5'-GCAAGGTCCTACGCTTCCAA-3' pour CYP2D6-A (D6\*3) et SEQ ID N°3 5'-CCGTTCTGTCCCGAGTAT-3' et SEQ ID N°4 5'-GGCTATCACCAGGTGCTG-3' pour CYP2D6-C (D6\*9)] et par RFLP  
25 avec l'enzyme *Msp*I.

La délétion du gène GSTM1 a été déterminée par PCR de l'ADN génomique en utilisant la méthode décrite par Brokmöller et al. (*Cancer Res.*, 1994, 54, pp. 4103-4111).

## **2. Génotype pour GSTM1 et CYP2D6**

- 5 Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 1 ci-dessous. Ce tableau résume le génotype pour CYP2D6 et GSTM1 chez les 103 patients étudiés. « wt » signifie « wild type allele » (allèle sauvage) et les chiffres 3, 4, 5, 6 et 9 correspondent respectivement aux mutations CYP2D6-A, CYP2D6-B, CYP2D6-D, CYP2D6-T et CYP2D6-C. En outre le symbole « (-) » signifie que le gène GSTM1 présente une
- 10 délétion homozygote, et le symbole « (+) » signifie que le gène GSTM1 ne présente pas une délétion homozygote.

Gène	Génotype (%)								
CYP2D6	wt/wt	wt/4	4/4	wt/5	wt/3	wt/9	4/5	4/9	wt/6
	49 (48,5)	30 (28,2)	7 (6,8)	6 (5,8)	4 (3,9)	4 (3,9)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
GSTM1	GSTM1	GSTM1							
	(-)	(+)							
	51 (49,5)	52 (50,5)							

**Tableau 1 : Génotypes pour CYP2D6 et GSTM1 chez les patients atteints de la maladie de Parkinson**

53 des patients atteints de la maladie de Parkinson de la série présentent au moins une mutation allélique de CYP2D6 (soit 51,5 %), les autres patients ayant un génotype sauvage (« wt/wt »). Le génotype mutant le plus fréquent est wt/4 (CYP2D6-B) dans 28,2 % des cas, 7 patients étant homozygotes 4/4. Les mutants hétérozygotes autres que wt/4 (c'est-à-dire wt/3 ou 9 ou 5 ou 6) concernent un total de 14,6 % des patients de la série, les patients hétérozygotes ayant les 2 allèles du gène CYP2D6 mutées (c'est-à-dire 4/9 et 4/5) représentant 2 % des cas.

L'allèle le plus fréquent de la série est CYP2D6-B (D6\*4) dans 21,8 % des cas, les autres mutations ne représentant que moins de 5 % des cas.

Si on désigne par  $p$  la fréquence de l'allèle sauvage (« wt ») et par  $q$  celle de l'ensemble des allèles mutants (homozygotes 4/4, hétérozygotes 4/9 et 4/5), les fréquences génotypiques au polymorphisme CYP2D6 sont en équilibre de Hardy-Weinberg complet ( $X^2 = 0$ ) dans la série. L'équilibre de Hardy-Weinberg est également respecté pour l'allèle CYP2D6-B seul dans la série ( $X^2 = 0,98$ ) ainsi que pour tous les autres allèles mutants de CYP2D6 considérés séparément. Il n'y a donc pas de biais sélectif ou d'échantillonnage dans cette série de patients.

51 patients (49,5 %) des patients présentent une délétion homozygote du gène GSTM1. La technique de PCR utilisée dans la présente étude ne permet pas de

différencier les patients ne présentant pas de délétion de GSTM1 des patients présentant seulement une délétion hétérozygote de GSTM1.

Si on désigne par  $p$  la fréquence allélique (-) dans la série de patients étudiée et par  $q$  la fréquence d'allèles non-délétés, l'application de l'équilibre de Hardy-Weinberg donne  $p^2 = 0,495$  ( $p = 0,704$ ),  $q (= 1-p) = 0,296$ ,  $2pq = 0,417$  et  $q^2 = 0,088$ . La fréquence allélique  $p$  est donc de 70%, et la fréquence des hétérozygotes attendus est de 42%.

### **3. Interaction entre les allèles GSTM1 et CYP2D6**

Les sujets présentant une déficience métabolique de CYP2D6 (appelés sujets « PM » pour « Poor Metabolizer ») sont définis comme étant les sujets ayant les deux allèles mutés (c'est-à-dire à la fois les mutants homozygotes et également les mutants hétérozygotes composites). Dans la série des 103 patients atteints de la maladie de Parkinson, 9 patients sont PM (7 homozygotes 4/4, un hétérozygote composite 4/5 et un 4/9).

CYP2D6 et GSTM1 ne sont pas génétiquement liés, du fait de leur localisation sur des chromosomes différents (le chromosome 22 et le chromosome 1 respectivement). Il n'est possible d'étudier leur interaction statistique que par une étude des cas par rapport au hasard, puisque cette interaction chez les témoins n'a pas été étudiée. Le tableau 2 résume le rapport de risque ( $RR$ ) entre les patients présentant une délétion homozygote de GSTM1 et qui sont PM pour CYP2D6 :

Gène	GSTM1	CYP2D6	<i>p</i> (%)	<i>RR</i>
Génotype	(-)	PM	8 (7,8 %)	0,16
	(-)	non-PM	43 (41,7 %)	0,84
	(+)	PM	1 (1,0 %)	0,02
	(+)	non-PM	51 (49,5 %)	1

**Tableau 2 : Effets polymorphiques combinés des génotypes GSTM1 et CYP2D6 chez les patients atteints de la maladie de Parkinson et leur rapport de risque**

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Le rapport de risque des patients d'être 0/1 [PM/(-)] est :  $RR_{01} = 8/51$ ,
- 5      - le rapport de risque des patients d'être 0/0 [non-PM/(-)] est :  $RR_{00} = 43/51$  et
- le rapport de risque des patients d'être 1/1 [PM/(+)] est :  $RR_{11} = 1/51$ ,

L'écart par rapport à la simple interaction multiplicative entre les deux gènes a été calculé de la façon suivante :  $RR_{11}/(RR_{01} \cdot RR_{10}) = 9,50$  dans le cas présent.

- 10      Cette valeur est supérieure à 1, ce qui indique qu'il existe un effet synergique entre la délétion homozygote de GSTM1 et les sujets déficients métaboliquement pour CYP2D6 (le test exact de Fisher donne  $p = 0,016$ ), et l'interaction est statistiquement significative au seuil de 5%.

- 15      Le même calcul a été réalisé pour étudier l'éventuelle interaction entre la délétion homozygote de GSTM1 et le seul allèle D6\*4(B) (allèle mutant de CYP2D6 le plus fréquent). Le rapport *RR* entre les patients présentant la délétion homozygote de GSTM1 et présentant au moins un allèle D6\*4 donne :  $RR = 2,18$  et le test de Fisher donne  $p = 0,069$  (à la limite du significatif au seuil de 5%).



**Exemple 2 : procédé d'obtention d'une souris transgénique****1. Génération d'une souris transgénique exprimant la protéine humaine CYP2D6-B**

La mutagenèse de CYP2D6-B humaine est faite via l'utilisation d'un système  
5 de mutagenèse *in vitro* comme le Sculptor<sup>TM</sup> (Amersham, France). La région codante  
de CYP2D6-B, incluant un motif consensus Kozak, est sous-clonée dans un vecteur  
de clonage du type Bluescript (Stratagène) et les mutations sont introduites selon le  
protocole fourni par le fabricant via l'utilisation d'oligonucléotides contenant la  
mutation désirée. Les séquences mutées sont à vérifier par analyse de séquence.

10 **2. Génération et identification des souris transgéniques CYP2D6-B**

Pour la construction du transgène, l'ADNc codant pour la CYP2D6-B mutée  
humaine est sous-clonée dans le polylinker d'un vecteur d'expression transgénique  
ubiquitaire comme le HMG (Czech et al., 1997) ou spécifique de certains tissus/types  
cellulaires comme le THY1 (Lüthi et al., J. Neuroscience, 17, pp. 4688-99), NSE,  
15 PDGF, ou encore prion. Un kit de préparation de plasmide (Qiagen) est utilisé pour  
préparer de l'ADN superenroulé. Pour la microinjection, les séquences du vecteur  
sont à éliminer par digestion avec une enzyme de restriction définie, laissant intacte la  
totalité du transgène et le séparant des séquences inutiles du vecteur de clonage.  
Ensuite, le fragment contenant la cassette d'expression est purifié par électrophorèse  
20 sur un gel d'agarose.

Les aliquotes destinés à la microinjection sont dialysés contre un tampon TE  
(10 mM Tris pH 7,4 ; 0,1 mM EDTA) sur un filtre flottant (Millipore ; type de  
membrane : VS ; 0,025 µm) puis filtrés (Spin-X ; Costar ; membrane polyacétate ;  
0,22 µm). L'ADN est dilué à la concentration finale de 1-2 ng/µl pour la  
25 microinjection. Le fragment purifié est injecté dans un des deux pronucléi des  
ovocytes fertilisés de souris. Les embryons survivants sont immédiatement  
transplantés dans l'oviducte de mères adoptives (« pseudopregnant »). La présence du  
transgène chez les nouveau-nés est déterminée soit par PCR soit par une analyse en

Southern, en utilisant des sondes/séquences spécifiques. Par l'ensemble de ces analyses, tout réarrangement majeur ou délétions du transgène dans les fondateurs et leur descendance peuvent être exclus.

### **3. Génération d'animaux transgéniques comportant la protéine humaine CYP2D6-B dans leur génome**

On utilise la technologie de recombinaison homologue dans les cellules souches pour introduire le gène CYP2D6-B à la position prédéfinie désirée dans le gène de la souris. Les amorces et échantillons décrits dans la présente invention peuvent être facilement utilisés pour cribler des bibliothèques génomiques isogéniques de souris (bibliothèques lambda, BAC, YAC ...) afin d'isoler et de cloner le gène correspondant de la souris. Ledit gène de la souris est caractérisé pour son organisation génomique et sa séquence en utilisant les techniques standard connues de l'homme de l'art (cartographie des sites de restriction, séquençage, outils bioanalytiques) afin de définir la place exacte où l'ADNc humain doit être inséré pour obtenir le profil d'expression de l'ADNc humain désiré tout en interrompant définitivement l'expression du gène murin. Une fois la position exacte identifiée, on construit un vecteur de ciblage standard pour les cellules souches (c'est-à-dire un vecteur ayant des marqueurs pour la sélection des événements désirés, lesdits marqueurs étant tous bien connus de l'homme de l'art spécialiste du domaine). Rapidement, une cassette de sélection (gène de résistance à un antibiotique) est mise en limite des extrémités 3' et 5' des fragments d'ADN génomique de la souris (2-6 kb) identiques aux extensions 3' et 5' de la séquence du gène murin CYP2D6-B situé immédiatement après le site d'insertion sélectionné.

Sur la base de la connaissance du gène de la souris, un vecteur de contrôle positif pour le criblage des cellules souches recombinantes est généré (le vecteur reproduit le locus du gène murin une fois l'intégration réussie) afin d'optimiser et valider la procédure de criblage à haut débit.

Conformément aux procédures standards, l'ADN est purifié pour les essais de ciblage. Le vecteur de ciblage est introduit dans les cellules souches en utilisant des

techniques d'électroporation standardisées, après quoi les clones de cellules souches sont soumis à une procédure de criblage séquentiel (antibiotiques) de façon à favoriser les clones de cellules souches portant la recombinaison désirée. En général, le criblage prend environ 2 semaines. Les clones des cellules souches résistants sont  
5 criblés par PCR et/ou Southern.

Les clones des cellules souches ayant la recombinaison désirée sans autre modification détectable dans leur génome sont développés de façon à obtenir suffisamment de cellules. Puis, lesdites cellules sont injectées dans des embryons de 3 jours et demi obtenus d'une femelle ayant ovulé naturellement. Les blastocytes  
10 survivants (comportant les cellules souches) sont implantés dans une femelle receveuse qui permettra le développement des blastocytes à leur terme et donnera naissance à des souriceaux nouveau-nés composés de cellules provenant des blastocytes hôtes et des clones de cellules souches. Ce type d'animal est appelé « animal chimère ».

15 Ces chimères (de préférence des mâles puisque la plupart des lignées de cellules souches sont obtenues de souris mâles) sont « mariées » avec des souris de type sauvage de façon à obtenir des animaux hétérozygotes pour la modification. L'élevage d'animaux hétérozygotes entre eux permet de générer des animaux homozygotes.

20 **4. Génération d'animaux transgéniques comportant la mutation de la protéine humaine CYP2D6-B dans leur gène correspondant**

De la même façon que décrit précédemment, le gène murin est isolé et caractérisé. Pour ce type de modification, il est essentiel de comparer le gène humain et le gène murin de façon à identifier la position exacte où le point de mutation trouvé  
25 chez l'homme doit être introduit dans le gène murin. Une bioanalyse est essentielle à cette étape. A la fin, le vecteur de ciblage est élaboré et assemblé de la même façon que décrit ci-avant. Après recombinaison homologue réussie, rien d'autre que le point de mutation désiré n'a changé dans la séquence codante du gène murin. Certains marqueurs de sélection peuvent rester dans un intron, mais ils n'ont en général aucune

influence sur l'expression du gène. Si nécessaire, ils peuvent être éliminés en utilisant une seconde génération de vecteurs de ciblage incluant des éléments de reconnaissance recombinaise. Une fois la construction assemblée, les étapes sont identiques à celles de la procédure décrite précédemment.

## 5 5. Génération d'animaux transgéniques dont le gène GSTM1 est inactivé

On procède de façon analogue aux procédures décrite pour le gène CYP2D6-B. Des amorces et échantillons spécifiques sont utilisés pour isoler et cloner l'homologue GSTM1 de la souris. Lorsque la structure et la séquence pertinente du gène GSTM1 de la souris sont établies, la localisation la plus appropriée dans le gène pour permettre d'inactiver définitivement le gène est identifiée. Le vecteur de ciblage est alors assemblé et introduit dans les cellules souches. Les cellules sont criblées et les animaux transgéniques obtenus comme précédemment.

## 6. Génération des animaux double transgéniques

Les animaux transgéniques sont obtenus et identifiés selon des procédures standard déjà décrites (e.g. « Manipulating the Mouse Embryo » ; Hogan et al CSH Press ; Cold Spring Harbor. N.Y.).

## 7. Analyse par Western blot

Le tissu cérébral de souris transgéniques et de souris contrôles non transgéniques (littermate) est homogénéisé sur de la glace dans une solution de sucrose 0,32 M contenant des inhibiteurs de protéase (Complete™, Boehringer-Mannheim, Allemagne). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 4°C pendant 5 minutes à 1500g. La concentration en protéines dans le surnageant est mesurée à l'aide du test de protéine BCA (Pierce, USA). Pour la détection de CYP2D6-B ou GSTM1, 25 µg d'extrait protéique sont incubés à 56°C pendant 20 minutes dans du tampon de dépôt Laemmli contenant de l'urée à 8 mM et du dithiothreitol à 50 mM. Pour la détection de CYP2D6-B et de GSTM1, 25 µg d'extrait protéique sont dénaturés à 95°C pendant 10 minutes dans 30 µl du tampon standard de dépôt

Laemmli. Les protéines sont fractionnées par électrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE). Après transfert des protéines sur filtre de nitrocellulose (Amersham, France), le filtre est chauffé dans du PBS pendant 5 minutes afin d'augmenter la sensibilité, et immédiatement saturé avec 5 % (poids/volume) de lait écrémé en poudre dans du TBST à 850 mM (Tris-HCl pH 8,1, 150 mM NaCl, 0,05 % (vol/vol) Tween 20) pendant 1 heure et incubé la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire en tampon TBST seul. La liaison de l'anticorps est détectée avec un anticorps anti-IgG conjugué à la peroxidase de Raifort (Amersham, France) suivi d'un système de détection par chemiluminescence (Amersham, France) selon les instructions du fabricant. Pour la détection de CYP2D6-B ou GSTM1, les anticorps monoclonaux ou polyclonaux sont à utiliser dans des conditions faciles à établir par l'homme de l'art.

## **8. Manipulation des animaux**

Les animaux doivent être hébergés dans des conditions de température et d'humidité contrôlées et soumis à un cycle de 12 heures de jour/ 12 heures de nuit (lumière 7 :00 EST). Les animaux ont libre accès à l'alimentation et à l'eau. Les expériences menées sur ces animaux sont à réaliser avec l'accord du Comité d'Ethique d'Aventis Pharma sur le soin et l'utilisation des animaux, en conformité avec les standards du « Guide for the care and use of laboratory animals » (National Research Council ILAR) et dans le respect des règlements français et de la directive CEE.

## **9. Neurohistopathologie**

### **9.1. Préparation du tissu cérébral**

Les souris doivent être profondément anesthésiées (Pentobarbital: 60 mg/ml/kg i.p., Kétamine: 40 mg/ml/kg i.p.) puis perfusées en transcardiaque avec du sérum physiologique puis du paraformaldéhyde (4% dans du PBS). Les cerveaux sont ensuite prélevés puis postfixés dans la même solution de fixation 24 heures à 4°C. Après la fixation, les cerveaux sont séparés en hémicerveaux droit et gauche puis soumis au protocole classique d'enrobage dans la paraffine.

Les hémicerveaux gauches enrobés dans la paraffine des souris transgéniques et non transgéniques, et également des blocs de tissu de cerveau humain postmortem (cortex frontal) de sujets atteints par la maladie de Parkinson et d'un sujet contrôle sont coupés à 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (coupes sériées), via l'utilisation d'un microtome  
5 (LEICA RM 2155, France). Les blocs de tissu correspondants aux hémicerveaux droits des souris transgéniques et non transgéniques sont coupés à une épaisseur de 25  $\mu\text{m}$ .

Pour chaque expérience d'immunohistochimie, les coupes de cerveaux doivent d'abord être déparaffinées avec du xylène et déshydratées dans de l'éthanol 100 %.

10 Les coupes sont ensuite incubées dans de l'eau oxygénée (1% dans du méthanol) afin de bloquer les activités peroxidasiques endogènes, rincées dans de l'éthanol et du tampon citrate (citrate de sodium à 10 mM, pH 6) et finalement placées dans un micro-ondes (650W, Whirlpool) pendant 2 fois 5 minutes dans la solution de citrate. Pour les expériences d'immunomarquage des protéines CYP2D6-B et GSTM1, les  
15 coupes sont soumises à une étape supplémentaire d'incubation de 3 minutes dans l'acide formique à 80%.

### **9.2. Marquage immuno-enzymatique**

Après une incubation de 30 minutes dans du tampon de blocage (sérum normal de chèvre (Chemicon) à 10% dans du PBS contenant 0,1% de triton (Sigma)),  
20 les coupes de cerveaux déparaffinées sont incubées dans la solution d'Ac primaire (toute la nuit à 4°C). Après rinçages, les coupes sont mises en présence de l'Ac secondaire biotinylé (pendant 2 heures à température ambiante) puis en présence du complexe avidin-biotin peroxidase selon les instructions du fabricant (Kit ABC Vectastin, Laboratoires Vector, Burlingame, CA). La 3-3'-diaminobenzidine est  
25 utilisée comme chromogène pour l'enzyme peroxidase.

Pour les expériences de préabsorption, l'Ac anti-Bax (anticorps P19, Santa Cruz) est incubé avec le peptide synthétique Bax (Contrôle peptide P19, Santa Cruz ; concentrations du peptide testées: 0,002 et 0,02 et 0,2 mg/ml) pendant au moins 12 heures avant d'être utilisé selon le protocole d'immunohistochimie décrit

précédemment. L'Ac anti-cytochrome C (7H8.2C12, Pharmingen) est incubé selon le même protocole avec du cytochrome C purifié exogène de coeur de cheval ou de rat (Sigma) (concentrations des protéines purifiées testées: 0,01 et 0,1 mg/ml).

REVENDICATIONS

1. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet caractérisée en ce qu'elle comprend une ou plusieurs étapes, simultanées ou non, de détection de la présence conjointe de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la  
5      délétion homozygote de GSTM1.
2. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites étapes de détection sont effectuées directement ou indirectement à partir d'échantillons biologiques, et simultanément ou non pour chacun des deux gènes CYP2D6-B et GSTM1.
- 10    3. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet selon la revendication 2, caractérisée en ce que lesdits échantillons biologiques sont des échantillons contenant des cellules nucléées.
4. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet selon les revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que lesdits échantillons biologiques  
15    sont des échantillons de sang, de sperme ou de cheveux.
5. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que les étapes de détection sont des étapes de détection de la seule présence ou non de la protéine CYP2D6-B à l'exclusion de toute autre forme mutée ou sauvage, et de la présence ou  
20    de l'absence de la protéine GSTM1, ou bien des étapes de détection de la présence ou de l'absence de l'ADN portant la mutation homozygote CYP2D6-B et de l'ADN présentant la délétion homozygote de GSTM1.
6. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdites étapes de détection de la  
25    présence ou de l'absence des ADN portant la mutation homozygote CYP2D6-B et présentant la délétion homozygote de GSTM1 sont effectuées par combinaison des techniques de Réaction de Polymérisation en Chaîne (« PCR »), de Southern Blotting,



de Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (« RFLP »), et/ou de séquençage direct.

7. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson chez un sujet selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdites étapes de détection de la seule  
5 présence ou non de la protéine CYP2D6-B à l'exclusion de toute autre forme mutée ou sauvage, et de la présence ou de l'absence de la protéine GSTM1 sont effectuées par des réactions immunologiques mettant en œuvre des anticorps spécifiques.

8. Méthode d'analyse d'échantillons biologiques prélevés sur un sujet caractérisée en ce que :

- 10 a) on détermine le génotype pour CYP2D6 et GSTM1,  
b) on convertit les données obtenues en a) afin de pronostiquer le risque dudit sujet de développer la maladie de Parkinson et l'efficacité de traitements thérapeutiques envisageables pour cette maladie.

9. Kit de diagnostic ou de pronostic de la maladie de Parkinson caractérisé en ce qu'il  
15 comprend les différents éléments nécessaires pour effectuer la détection de la présence ou de l'absence des ADN portant la mutation homozygote CYP2D6-B et présentant la délétion homozygote de GSTM1, ou pour effectuer la détection de la seule présence ou non de la protéine CYP2D6-B à l'exclusion de toute autre forme mutée ou sauvage, et de la présence ou de l'absence de la protéine GSTM1,  
20 individuellement ou mélangés.

10. Animaux transgéniques, lignées de cellules souches et lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, dans le génome desquels est insérée au moins une séquence d'ADN exogène génomique portant la mutation homozygote CYP2D6-B et dont le gène GSTM1 est inactivé.

25 11. Animaux transgéniques, lignées de cellules souches et lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, selon la revendication 10 qui sont knock-out ou knock-in pour le gène CYP2D6 et knock-out pour le gène GSTM1.

12. Animaux transgéniques selon l'une des revendications précédentes caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi les mammifères non-humains.

13. Procédé d'obtention d'animaux transgéniques, de lignées de cellules souches et de lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend

a) la génération d'animaux transgéniques, de lignées de cellules souches et de lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, exprimant la protéine CYP2D6-B humaine à l'exclusion de toute autre forme sauvage ou mutée,

b) la génération d'animaux transgéniques, de lignées de cellules souches et lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, ayant la fonction GSTM1 inactivée,

c) la génération d'animaux double transgéniques, de lignées de cellules souches et de lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, comportant dans leur génome les deux modifications décrites en a) et en b).

14. Utilisation d'animaux transgéniques, de lignées de cellules souches et de lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, selon l'une des revendications 10 à 12 pour tester l'activité d'agents ou de méthodes destinés à prévenir et/ou traiter la maladie de Parkinson.

15. Cellule extraite d'animaux transgéniques tel que décrit dans l'une des revendications 10 à 12.

16. Utilisation d'une cellule telle que décrite dans la revendication 15 pour la mise en évidence de composés destinés au traitement de la maladie de Parkinson.

17. Méthode de traitement de la maladie de Parkinson caractérisée en ce qu'elle comprend :

-une ou plusieurs étapes, simultanées ou non, de détection de la présence conjointe de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la délétion homozygote de GSTM1 chez un sujet, et

-l'administration d'un composé, ou d'un mélange de composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie de Parkinson chez un sujet présentant conjointement la mutation homozygote CYP2D6-B et la délétion homozygote de GSTM1.

5

18. Utilisation d'un composé, ou d'un mélange de composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie de Parkinson pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'un sujet atteint par la maladie de Parkinson, chez lequel la présence conjointe de la mutation homozygote CYP2D6-B et de la délétion homozygote de

10 GSTM1 a été mise en évidence préalablement au traitement.

## LISTE DE SEQUENCES

<110> AVENTIS PHARMA SA

<120> METHODE DE DIAGNOSTIC ET DE PRONOSTIC DE LA MALADIE DE  
PARKINSON

<130> DIAGNOSTIC PARKINSON

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 1  
gatgagctgc taactgagcc c 21

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 2  
gcaaggtcct acgcttccaa 20

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 3  
ccgttctgtc ccgagtat 18

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4  
ggctatcacc aggtgctg 18